Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale" n. 293 del 23 ottobre 1982

Spedizione in abbonamento postale - Gruppo I

DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA Roma - Sabato, 23 ottobre 1982 SI PUBBLICA NEL POMERIGGIO DI TUTTI I GIORNI MENO I FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DI GRAZIA E GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE DELLE LEGGI E DECRETI - CENTRALINO 65101
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - LIBRERIA DELLO STATO - PIAZZA G. VERDI, 10 - 00100 ROMA - CENTRALINO 85081

N. 67

MINISTERO DELLA SANITA'

DECRETO 23 agosto 1982.

Approvazione dei metodi ufficiali di analisi per il controllo dei tipi di latte destinato all'alimentazione umana.

SOMMARIO

MINISTERO DELLA SANITÀ

LEGGI E DECRETI

MINISTERO DELLA SANITÀ

DECRETO 23 agosto 1982.

Approvazione dei metodi ufficiali di analisi per il controllo dei tipi di latte destinato all'alimentazione umana.

IL MINISTRO DELLA SANITA'

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 10 maggio 1982, n. 514, relativo all'attuazione della direttiva (CEE) n. 76/118, riguardante taluni tipi di latte conservato, parzialmente o totalmente disidratato, destinato all'alimentazione umana;

Vista la direttiva della commissione CEE del 13 novembre 1979, n. 79/1067, che fissa i metodi comunitari di analisi per il controllo di taluni tipi di latte conservato, parzialmente o totalmente disidratato, destinato all'alimentazione umana;

Sentita la commissione permanente per la determinazione dei metodi ufficiali di analisi delle sostanze alimentari;

Visto l'art. 21 della legge 30 aprile 1962, n. 283;

Decreta:

Art. 1.

Sono approvati i metodi ufficiali di analisi, riportati in allegato, per il controllo dei tipi di latte destinato all'alimentazione umana, previsti dal decreto del Presidente della Repubblica 10 maggio 1982, n. 514.

Art. 2.

Il presente decreto sarà pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, addì 23 agosto 1982

Il Ministro: ALTISSIMO

ALLEGATO I

ALLEGATO I

CAMPO DI APPLICAZIONE DEI PRIMI METODI DI ANALISI COMUNITARI DA APPLICARSI AI SENSI DELLA DIRETTIVA CONCERNENTE TALUNI TIPI DI LATTE PARZIALMENTE O TOTALMENTE DISIDRATATO.

I. *Disposizioni generali.*

II. *Determinazione della materia secca* nel:

- latte concentrato ricco di materia grassa o latte concentrato non zuccherato ricco di materia grassa (allegato II, metodo 1);
- latte concentrato o latte concentrato non zuccherato o latte intero concentrato (allegato II, metodo 1);
- latte concentrato parzialmente scremato o latte concentrato parzialmente scremato non zuccherato (allegato II, metodo 1);
- latte concentrato scremato o latte concentrato scremato non zuccherato (allegato II, metodo 1);
- latte concentrato zuccherato o latte intero concentrato zuccherato (allegato II, metodo 1);
- latte concentrato parzialmente scremato zuccherato (allegato II, metodo 1);
- latte concentrato scremato zuccherato (allegato II, metodo 1)

III. *Determinazione dell'umidità* nel:

- latte in polvere ricco di materia grassa o polvere di latte ricco di materia grassa (allegato II, metodo 2);
- latte in polvere, latte intero in polvere, polvere di latte o polvere di latte intero (allegato II, metodo 2);
- latte parzialmente scremato in polvere o polvere di latte parzialmente scremato (allegato II, metodo 2);
- latte scremato in polvere o polvere di latte scremato (allegato II, metodo 2).

IV. *Determinazione della materia grassa* nel:

- latte concentrato ricco di materia grassa o latte concentrato non zuccherato ricco di materia grassa (allegato II, metodo 3);
- latte concentrato o latte concentrato non zuccherato o latte intero concentrato (allegato II, metodo 3);
- latte concentrato parzialmente scremato o latte concentrato parzialmente scremato non zuccherato (allegato II, metodo 3).
- latte concentrato scremato o latte concentrato scremato non zuccherato (allegato II, metodo 3);
- latte concentrato zuccherato e latte intero concentrato zuccherato (allegato II, metodo 3);
- latte concentrato parzialmente scremato zuccherato (allegato II, metodo 3);
- latte concentrato scremato zuccherato (allegato II, metodo 3);
- latte in polvere ricco di materia grassa o polvere di latte ricco di materia grassa (allegato II, metodo 4);
- latte in polvere, latte intero in polvere, polvere di latte o polvere di latte intero (allegato II, metodo 4);
- latte parzialmente scremato in polvere o polvere di latte parzialmente scremato (allegato II, metodo 4);
- latte scremato in polvere o polvere di latte scremato (allegato II, metodo 4).

V *Determinazione del saccarosio* nel

- latte concentrato zuccherato o latte intero concentrato zuccherato (allegato II, metodo 5);
- latte concentrato parzialmente scremato zuccherato (allegato II, metodo 5);
- latte concentrato scremato zuccherato (allegato II, metodo 5).

VI. *Determinazione dell'acido lattico e dei lattati* nel:

- latte in polvere ricco di materia grassa o polvere di latte ricco di materia grassa (allegato II, metodo 6);
- latte in polvere, latte intero in polvere, polvere di latte o polvere di latte intero (allegato II, metodo 6);
- latte parzialmente scremato in polvere o polvere di latte parzialmente scremato (allegato II, metodo 6);
- latte scremato in polvere o polvere di latte scremato (allegato II, metodo 6).

VII. *Determinazione dell'attività fosfatasica* nel

- latte in polvere ricco di materia grassa o polvere di latte ricco di materia grassa (allegato II, metodi 7 o 8);
- latte in polvere, latte intero in polvere, polvere di latte o polvere di latte intero (allegato II, metodi 7 o 8);
- latte parzialmente scremato in polvere o polvere di latte parzialmente scremato (allegato II, metodi 7 o 8);
- latte scremato in polvere o polvere di latte scremato (allegato II, metodi 7 o 8).

ALLEGATO II

ALLEGATO II

METODI DI ANALISI RELATIVI ALLA COMPOSIZIONE DI TALUNI TIPI DI LATTE CONSERVATO PARZIALMENTE O TOTALMENTE DISIDRATATO DESTINATO ALL'ALIMENTAZIONE UMANA.

DISPOSIZIONI GENERALI

1. *Preparazione del campione per l'analisi.*

1.1.
- Latte concentrato ricco di materia grassa o latte concentrato non zuccherato ricco di materia grassa.
- Latte concentrato o latte concentrato non zuccherato o latte intero concentrato.
- Latte concentrato parzialmente scremato o latte concentrato parzialmente scremato non zuccherato.
- Latte concentrato scremato o latte concentrato scremato non zuccherato.

Agitare e capovolgere il contenitore chiuso. Aprire il contenitore e versare lentamente il latte in un secondo recipiente provvisto di chiusura ermetica, mescolando per ripetuto travaso. Fare in modo che tutto il grasso e il latte aderenti alla parete e ai due fondi del recipiente risultino ben mescolati al resto del campione. Chiudere il recipiente. Se il contenuto non è omogeneo, riscaldare in bagnomaria a 40°C. Agitare energicamente ogni 15 minuti. Dopo 2 ore, togliere il recipiente dal bagnomaria e lasciare che ritorni a temperatura ambiente. Togliere il coperchio e rimescolare bene il contenuto del recipiente con un cucchiaio o una spatola (se il grasso si è separato, il campione non può essere analizzato). Conservare in frigorifero.

1.2.
- Latte concentrato zuccherato o latte intero concentrato zuccherato.
- Latte concentrato parzialmente scremato zuccherato.
- Latte concentrato scremato zuccherato.

Scatole: riscaldare la scatola chiusa in bagnomaria a 30–40°C per 30 minuti circa. Aprire la scatola e, con un cucchiaio o una spatola, rimescolare bene il contenuto, in senso verticale e rotatorio, in modo da miscelare intimamente gli strati superiori ed inferiori col resto del contenuto. Fare in modo che il latte aderente alla parete e ai fondi della scatola sia incorporato nel campione. Per quanto possibile, versare il contenuto in un secondo recipiente fornito di coperchio a tenuta d'aria. Chiudere il recipiente e conservarlo in frigorifero.

Tubetti: aprire il tubetto tagliandone le estremità. Versare il contenuto in un recipiente fornito di coperchio a tenuta d'aria. Tagliare poi il tubetto nel senso della lunghezza. Raschiar via tutto il materiale che aderisce all'interno e mescolarlo accuratamente col resto del contenuto. Conservare il recipiente in frigorifero.

1.3.
- Latte in polvere ricco di materia grassa o polvere di latte ricco di materia grassa.
- Latte in polvere, latte intero in polvere, polvere di latte o polvere di latte intero.
- Latte parzialmente scremato in polvere o polvere di latte parzialmente scremato
- Latte scremato in polvere o polvere di latte scremato.

Trasferire la polvere di latte in un recipiente pulito e asciutto provvisto di coperchio a tenuta d'aria, di una capacità doppia rispetto al volume della polvere. Chiudere immediatamente il recipiente e mescolare bene la polvere di latte agitandolo e capovolgendolo ripetutamente. Durante la preparazione del campione, limitare, per quanto possibile, l'esposizione all'aria in modo da rendere minimo l'assorbimento di umidità.

2. *Reattivi.*

2.1. Acqua.

2.1.1. Quando si fa riferimento all'acqua, ai fini della dissoluzione, della diluizione o del lavaggio, deve intendersi acqua distillata od acqua demineralizzata di purezza equivalente.

2.1.2. Quando si parla, senza ulteriori precisazioni, di « dissoluzione », « soluzione » o « diluizione », s'intende che il solvente da adoperare è l'acqua.

2.2. Reattivi.

Tutti i reattivi impiegati debbono avere grado di purezza analitica, salvo indicazioni in contrario.

3. *Apparecchiatura.*

3.1. Elenchi delle apparecchiature.

Gli elenchi delle apparecchiature non comprendono le normali attrezzature di laboratorio.

3.2. Bilancia analitica.

Per « bilancia analitica » si intende una bilancia della sensibilità di almeno 0,1 mg.

4. *Espressione dei risultati.*

4.1. Calcolo delle percentuali

Salvo indicazioni in contrario, i risultati vanno calcolati come percentuale in peso del campione quale è stato ricevuto dal laboratorio.

4.2. Numero di cifre significative.

Il risultato non deve contenere più cifre significative di quante ne giustifichi la precisione del metodo d'analisi impiegato.

5. *Relazione dell'analisi.*

La relazione deve precisare il metodo d'analisi impiegato e i risultati ottenuti. Essa deve inoltre menzionare tutti i particolari del procedimento non specificati nel metodo d'analisi o facoltativi, nonché ogni circostanza che possa avere influenzato i risultati ottenuti.
La relazione dovrà fornire tutti i dati necessari per identificare completamente il campione.

Metodo 1 — DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN MATERIA SECCA (IN STUFA, A 99° C)

1. *Oggetto e campo di applicazione.*

Il presente metodo serve a determinare il contenuto in materia secca del:

- latte concentrato ricco di materia grassa o latte concentrato non zuccherato ricco di materia grassa;
- latte concentrato o latte concentrato non zuccherato o latte intero concentrato;
- latte concentrato parzialmente scremato o latte concentrato parzialmente scremato non zuccherato;
- latte concentrato scremato o latte concentrato scremato non zuccherato;
- latte concentrato zuccherato o latte intero concentrato zuccherato;
- latte concentrato parzialmente scremato zuccherato;
- latte concentrato scremato zuccherato.

2. *Definizione.*

Per contenuto in materia secca dei latti concentrati si intende il contenuto di sostanza secca determinato col presente metodo.

3. *Principio.*

Una quantità nota del campione viene diluita con acqua, mescolata con sabbia ed essiccata alla temperatura di 99 ± 1° C. La massa ottenuta dopo l'essiccazione rappresenta la massa della sostanza secca e viene calcolata come percentuale rispetto alla massa del campione.

4. *Reattivi.*

Sabbia di quarzo o sabbia di mare trattata con acido cloridrico (granulometria 0,18-0,5 mm, la sabbia deve cioè passare attraverso un setaccio da 500 micron ed essere trattenuta da un setaccio da 180 micron). Essa deve soddisfare alla seguente prova di controllo:

nella stufa (5.3) riscaldare per 2 ore 25 g circa di sabbia, secondo le modalità indicate da 6.1 a 6.3. Aggiungere 5 ml d'acqua, riscaldare di nuovo in stufa per 2 ore, lasciar raffreddare e ripesare. La differenza fra le due pesate non deve eccedere 0,5 mg.

Se necessario, trattare la sabbia con una soluzione di acido cloridrico al 25%, per la durata di 3 giorni, rimescolando di tanto in tanto. Lavare con acqua fino a scomparsa dell'acidità o della reazione dei cloruri nell'acqua di lavaggio. Essiccare a 160° C e ricontrollare come sopra descritto.

5. *Apparecchiatura.*

5.1. Bilancia analitica.

5.2. Capsule di metallo, preferibilmente di nichel, d'alluminio o d'acciaio inossidabile. Le capsule devono essere provviste di coperchi a ottima tenuta ma facili da togliere. Dimensioni consigliabili:

diametro = 60-80 mm; profondità = 25 mm circa.

5.3. Stufa di essiccazione a pressione atmosferica, ben ventilata e termostatata a 99 ± 1 °C. La temperatura deve essera uniforme in tutta la stufa.

5.4. Essiccatore, contenente gel di silice addizionato di un indicatore dell'umidità e attivato di recente, ovvero una sostanza essiccante equivalente.

5.5. Bacchette di vetro, appiattite a un'estremità, di lunghezza tale da poter essere contenute nelle capsule di metallo (5.2).

5.6. Bagnomaria, bollente.

6. *Modo di operare.*

6.1. Nella capsula (5.2), porre circa 25 g di sabbia (4) e una bacchetta di vetro (5.5).

6.2. Senza coprire, porre capsula, contenuto e coperchio nella stufa (5.3) e riscaldare per 2 ore.

6 3. Porre il coperchio sulla capsula e metterla nell'essiccatore (5.4). Lasciar raffreddare a temperatura ambiente e pesare con la precisione di 0,1 mg (sia Mo la massa trovata).

6.4. Inclinando la capsula, spostare tutta la sabbia da un lato. Nello spazio libero, introdurre 1,5 g circa di campione di latte concentrato zuccherato (3,0 g nel caso del latte concentrato non zuccherato). Rimettere a posto il coperchio e pesare con la precisione di 0,1 mg (sia M1 la massa trovata).

6.5. Togliere il coperchio, aggiungere 5 ml d'acqua e aiutandosi con la bacchetta di vetro, mescolare fra loro prima i due liquidi, poi la sabbia e la miscela liquida. Lasciare la bacchetta nella miscela.

6.6. Porre la capsula su bagnomaria bollente (5.6) finché l'acqua si sia evaporata; ciò richiede abitualmente 20 minuti. Con la bacchetta, agitare di tanto in tanto la mescolanza, in modo da mantenere la massa ben aerata e da evitare che essa si agglomeri una volta secca. Deporre la bacchetta all'interno della capsula.

6.7. Porre la capsula ed il coperchio nella stufa per un'ora e mezzo circa.

6.8. Rimettere il coperchio alla capsula e depositarla nell'essiccatore; lasciarla raffreddare a temperatura ambiente e pesarla con la precisione di 0,1 mg.

6.9. Rimettere capsula e coperchio nella stufa, scoprire la capsula e riscaldarla insieme al coperchio per un'altra ora.

6.10. Ripetere l'operazione descritta al punto 6.8.

6.11. Ripetere le operazioni descritte ai punti 6.9 e 6.10, finché la differenza di massa fra due successive pesate sia inferiore a 0,5 mg, ovvero finchë si osservi un aumento della massa. Se tale aumento si verifica nel calcolo di cui al punto 7.1 impiegare il valore più basso trovato per la massa. Sia M2 la massa finale registrata.

7. *Calcolo ed espressione dei risultati.*

Il contenuto in materia secca, espresso come percentuale sulla massa del campione, è dato dalla formula:

$$\frac{M2 - Mo}{M1 - Mo} \times 100$$

dove:

Mo = massa totale, espressa in grammi, della capsula, del coperchio e della sabbia dopo l'operazione 6.3;

M1 = massa totale, espressa in grammi, della capsula, del coperchio, della sabbia e del campione, dopo l'operazione 6 4;

M2 = massa totale, espressa in grammi, della capsula, del coperchio, della sabbia e del campione essiccato, dopo l'operazione 6.11.

8. *Ripetibilità.*

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate simultaneamente o in rapida successione dallo stesso analista adoperando lo stesso campione e nelle stesse condizioni, non deve superare 0,2 g di materia secca per 100 g del prodotto.

9. *Calcolo dei solidi totali del latte e dei solidi magri del latte.*

9.1. I solidi totali del latte, contenuti in un latte concentrato zuccherato, sono dati dall'espressione: materia secca (ottenuta secondo il metodo 1 dell'allegato II) meno il contenuto in saccarosio (ottenuto secondo il metodo 5 dell'allegato II).

9.2. I solidi magri del latte, contenuti in un latte concentrato zuccherato, sono dati dall'espressione: materia secca (ottenuta col metodo 1 dell'allegato II) meno il contenuto di saccarosio (ottenuto col metodo 5 dell'allegato II) meno il tenore in materia grassa (ottenuto col metodo 3 dell'allegato II).

.3. I solidi magri del latte, contenuti in un latte concentrato non zuccherato, sono dati dall'espressione: materia secca (ottenuta col metodo 1 dell'allegato II) meno il contenuto in materia grassa (ottenuto col metodo 3 dell'allegato II)

Metodo 2 — DETERMINAZIONE DEL TENORE IN UMIDITÀ (IN STUFA A 102° C)

Oggetto e campo di applicazione

Il presente metodo serve a determinare il tenore in umidità:

- del latte in polvere ricco di materia grassa o polvere di latte ricco di materia grassa;
- del latte in polvere, latte intero in polvere, polvere di latte o polvere di latte intero;
- del latte parzialmente scremato in polvere o polvere di latte parzialmente scremato;
- del latte scremato in polvere o polvere di latte scremato.

2 *Definizione*

Per tenore in umidità si intende la perdita di massa all'essiccazione, determinata con il presente metodo

3 *Principio*

Si determina la massa residua di un opportuno campione, dopo averlo essiccato fino a costanza della massa, a pressione atmosferica, in una stufa a 102 ± 1° C La perdita di massa viene calcolata come percentuale sulla massa del campione.

4. *Apparecchiatura*

4 1 Bilancia analitica.

4 2 Capsule, preferibilmente di vetro, di nichel, di alluminio o di acciaio inossidabile. Le capsule devono essere provviste di coperchi a ottima tenuta ma facili da togliere. Dimensioni consigliabili:

diametro = 60-80 mm; profondità = 25 mm circa.

4 3. Stufa da essiccazione a pressione atmosferica, ben ventilata, termostatata a 102 ± 1° C. La temperatura deve essere uniforme in tutta la stufa

4 4 Essiccatore, contenente gel di silice addizionato di un indicatore di umidità e attivato di recente, ovvero una sostanza essiccante equivalente.

5. *Modo di operare*

5 1 Aprire la capsula (4 2) e porla insieme al coperchio nella stufa (4.3): riscaldare per un'ora circa.

5 2. Porre il coperchio sulla capsula e metterla nell'essiccatore (4 4). Lasciare raffreddare a temperatura ambiente e pesare con la precisione di 0,1 mg Sia Mo la massa riscontrata.

5.3. Porre nella capsula 2 g circa del campione di latte in polvere, chiudere e pesare quanto più rapidamente possibile la capsula chiusa, con l'approssimazione di 0,1 mg. Sia M1 la massa trovata

5 4. Aprire la capsula e rimetterla in stufa per 2 ore insieme al coperchio

5 5. Chiudere la capsula, trasferirla nell'essiccatore, lasciarla raffreddare a temperatura ambiente e pesarla quanto più rapidamente possibile, con l'approssimazione di 0,1 mg.

5 6 Aprire la capsula e rimetterla in stufa per 1 ora, insieme al coperchio

5 7 Ripetere l'operazione 5 5

5 8 Ripetere le operazioni 5 5 e 5 6 finché la differenza di massa fra due successive pesate sia inferiore a 0,5 mg ovvero finché si osservi un aumento della massa. Se tale aumento si verifica, nel calcolo di cui al punto 6 1 impiegare il valore più basso trovato per la massa. Sia M2 la massa finale registrata.

6 *Calcolo ed espressione dei risultati*

La perdita di massa all'essiccazione, espressa come percentuale sulla massa del campione, è data dalla formula:

$$\frac{M1 - M2}{M1 - Mo} \times 100$$

dove:

Mo = massa totale, espressa in grammi, della capsula e del coperchio dopo l'operazione 5 2;

M1 = massa totale, espressa in grammi, della capsula, del coperchio e del campione, dopo l'operazione 5.3;

M2 = massa finale, espressa in grammi, della capsula, del coperchio e del campione dopo l'operazione 5.7.

7. *Ripetibilità.*

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate simultaneamente o in rapida successione dallo stesso analista adoperando lo stesso campione e nelle stesse condizioni, non deve superare 0,1 g di umidità per 100 g del prodotto.

Metodo 3 — DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN MATERIA GRASSA (METODO RÖSE-GOTTLIEB)

1. *Oggetto e campo di applicazione.*

Il presente metodo serve a determinare il contenuto di materia grassa nel:

- latte concentrato ricco di materia grassa o latte concentrato non zuccherato ricco di materia grassa;
- latte concentrato o latte concentrato non zuccherato o latte intero concentrato;
- latte concentrato parzialmente scremato o latte concentrato parzialmente scremato non zuccherato;
- latte concentrato scremato o latte concentrato scremato non zuccherato;
- latte concentrato zuccherato e latte intero concentrato zuccherato;
- latte concentrato parzialmente scremato zuccherato;
- latte concentrato scremato zuccherato.

2. *Definizione.*

Per contenuto in materia grassa dei vari tipi di latte concentrato, s'intende il contenuto di materia grassa determinato con il presente metodo.

3. *Principio.*

Il contenuto in materia grassa viene determinato per estrazione con etere etilico ed etere di petrolio, del grasso contenuto in una soluzione alcolico ammoniacale del campione, seguita da evaporazione dei solventi, pesata del residuo e suo calcolo come percentuale sulla massa del campione, in conformità del principio Röse-Gottlieb.

4 *Reattivi.*

Tutti i reattivi devono essere conformi ai requisiti specificati per la prova in bianco (6.1).
Se necessario, i reattivi possono essere ridistillati in presenza di circa 1 g di grasso di burro per ogni 100 ml di solvente.

4.1 Soluzione di ammoniaca, al 25% circa (m/m) di NH3 (densità a 20° C = 0,91), o soluzione più concentrata a titolo noto.

4.2. Etanolo al 96 ± 2% (v/v) ovvero, se esso non è disponibile, etanolo denaturato con metanolo, etilmetilchetone od etere di petrolio.

4.3 Etere etilico, esente da perossidi.

Nota 1: Per verificare l'assenza di perossidi, introdurre in un piccolo cilindro di vetro a tappo smerigliato, previamente lavato con etere, 10 ml dell'etere stesso ed 1 ml di soluzione al 10% di ioduro di potassio, preparata di recente. Agitare e lasciar riposare per 1 minuto. Nessuno dei due strati deve colorarsi di giallo.

Nota 2 L'etere etilico può essere mantenuto esente da perossidi introducendovi una lamina di zinco, umida per essere stata completamente immersa per 1 minuto in una soluzione diluita e acidificata di solfato di rame e successivamente risciacquata con acqua. Per ogni litro di soluzione impiegare circa 8000 mm^2 di lamina di zinco, tagliata in strisce abbastanza lunghe da raggiungere almeno la metà superiore del recipiente.

4 4. Etere di petrolio, con intervallo di ebollizione compreso tra 30 e 60° C.

4.5. Miscela solvente, da preparare poco prima dell'uso mescolando volumi uguali di etere etilico (4.3) e di etere di petrolio (4.4) (tutte le volte che si parla di miscela solvente, esso può essere sostituito dall'etere etilico o dall'etere di petrolio da soli).

5. *Apparecchiatura.*

5 1. Bilancia analitica.

5.2. Apparecchio da estrazione: tubi o palloni da estrazione, provvisti di tappo di vetro smerigliato o di altri materiali inerti rispetto ai solventi impiegati.

5 3. Palloni a fondo piatto, della capacità di 150-250 ml.

5.4. Stufa da essiccazione a pressione atmosferica, ben ventilata e termostatata a 102 ± 1 °C.

5 5. Granuli per regolare l'ebollizione, esenti da grassi, non porosi e non friabili durante l'uso, come ad esempio perline di vetro o frammenti di carburo di silicio (l'impiego di questo materiale è facoltativo: vedi punto 6.2.1).

5.6. Sifone; adattabile ai tubi da estrazione

5.7. Centrifuga.

6. *Modo di operare.*

6.1. Prova in bianco

Contemporaneamente alla determinazione del contenuto in materia grassa nel campione, effettuare una prova in bianco su 10 ml d'acqua, usando lo stesso tipo di apparecchiatura di estrazione, gli stessi reagenti nelle stesse quantità e lo stesso procedimento qui di seguito descritto, salvo il punto 6.2.2. Se il risultato sulla prova in bianco supera 0,5 mg, i reattivi vanno sottoposti a controllo e quelli impuri vanno purificati o sostituiti.

6 2. Determinazione.

6.2 1. Essiccare un pallone (5 3) (se necessario, unitamente ad alcuni granuli (5.5), destinati a regolare l'ebollizione durante la successiva eliminazione dei solventi), mantenendolo in stufa (5.4) per 30 minuti-1 ora. Lasciare che il recipiente assuma la temperatura della sala delle bilance e pesare con precisione, dopo raffreddamento, con l'approssimazione di 0,1 mg.

6.2.2. Agitare il campione preparato, ed immediatamente dopo pesare 2-2,5 g di latte concentrato zuccherato (o 4-5 g nel caso dei derivati del latte scremato), con l'approssimazione di 1 mg, direttamente nell'apparecchio da estrazione (5.2), o per differenza. Aggiungere acqua fino a 10,5 ml ed agitare dolcemente, riscaldando un poco (40-50 °C) finché il prodotto è completamente disperso. La dispersione del campione dev'essere completa; in caso contrario la determinazione va ripetuta.

6 2.3. Aggiungere 1,5 ml di ammoniaca al 25% (4 1), od un corrispondente volume di soluzione più concentrata e mescolare bene.

6.2.4. Aggiungere 10 ml di etanolo (4.2), e mescolare i liquidi, dolcemente ma a fondo, nell'apparecchio non chiuso.

6 2 5. Aggiungere 25 ml di etere etilico (4.3). Se necessario, raffreddare sotto acqua corrente; chiudere l'apparecchio e agitarlo vigorosamente per 1 minuto, capovolgendolo più volte.

6.2 6 Togliere con precauzione il tappo ed aggiungere 25 ml di etere di petrolio (4.4), utilizzando i primi ml per lavare il tappo e l'interno del collo dell'apparecchio, raccogliendo il liquido di lavaggio nell'interno di questo. Riapplicare il tappo; scuotere e capovolgere più volte per 30 secondi. Non agitare troppo vigorosamente se non è previsto l'uso della centrifuga (vedi punto 6.2.7)

6.2 7. Lasciare riposare l'apparecchio finché lo strato superiore del liquido è divenuto limpido e si è nettamente separato dallo strato acquoso inferiore Si può anche effettuare la separazione adoperando una centrifuga adatta.

Nota: Se si impiega una centrifuga non azionata da un motore trifase, possono aversi delle scintille, e pertanto si curerà di evitare esplosioni o incendi dovuti a vapori di etere (provenienti, ad esempio, da una provetta rotta).

6 2.8. Togliere il tappo, lavare il tappo stesso e l'interno del collo dell'apparecchio con pochi millilitri di miscela solvente (4.5), raccogliendo il liquido di lavaggio nell'apparecchio. Travasare con precauzione la massima parte possibile dello strato superiore di liquido decantandolo o sifonandolo (5.6) nel pallone preparato (6.2.1).

Nota: Se il travaso non viene effettuato per sifonaggio, può essere necessario aggiungere un po' d'acqua per sollevare la superficie di contatto fra i due liquidi in modo da facilitare la decantazione.

6 2 9. Lavare l'esterno e l'interno del collo dell'apparecchio o la estremità e la parte inferiore del sifone con pochi millilitri di miscela solvente. Fare in modo che il liquido di lavaggio dell'esterno dell'apparecchio defluisca nel pallone e che il liquido di lavaggio dell'interno del collo e del sifone defluisca nell'apparecchio di estrazione.

6 2.10. Procedere a una seconda estrazione ripetendo le fasi da 6.2.5 a 6.2.9 compresa, ma adoperando soltanto 15 ml di etere etilico e 15 ml di etere di petrolio.

6 2.11. Effettuare una terza estrazione ripetendo il procedimento 6.2.10, ma omettendo il lavaggio finale (6.2.9).

Nota: Quando si analizzano campioni di latte concentrato scremato non zuccherato o zuccherato, questa terza estrazione non è necessaria.

6 2 12. Evaporare o distillare con precauzione la massima quantità possibile di solvente (compreso l'etanolo). Se il recipiente è di piccola capacità, dopo ogni estrazione sarà necessario eliminare nel modo sopra indicato una parte del solvente.

6.2.13. Quando l'odore di solvente non è più percepibile, porre il recipiente nella stufa, coricato su un fianco, e riscaldarlo per un'ora.

6 2.14. Togliere il recipiente dalla stufa, lasciarlo raffreddare alla temperatura della sala delle bilance e pesarlo con l'approssimazione di 0,1 mg.

6.2.15. Ripetere le operazioni 6 2.13 e 6 2.14 con tempi di riscaldamento di 30-60 minuti finché la differenza fra due successive pesate sia inferiore a 0,5 mg ovvero si osservi un aumento della massa. Se tale aumento si verifica, nel calcolo di cui al punto 7.1 impiegare il valore più basso trovato per la massa. Sia M1 la massa finale ottenuta.

6.2.16. Aggiungere 15-25 ml di etere di petrolio, per confermare che la sostanza estratta è completamente solubile. Riscaldare blandamente ed agitare il solvente in senso rotatorio finché il grasso è disciolto.

6.2.16 1. Se la sostanza estratta è completamente solubile nell'etere di petrolio, la massa del grasso è data dalla differenza fra le masse determinate nel modo indicato ai punti 6.2.1 e 6.2.15.

6.2.16.2. Se è presente una certa quantità di residuo insolubile, o in caso di dubbio, estrarre completamente il grasso dal recipiente lavando ripetutamente con etere di petrolio tiepido, facendo in modo che il residuo insolubile si depositi prima di ogni decantazione. Lavare tre volte l'esterno del collo del recipiente. Riscaldare per 1 ora in stufa il recipiente, deposto sul fianco; lasciarlo raffreddare alla temperatura della sala delle bilance come prima indicato al punto 6.2.1 e pesare con l'approssimazione di 0,1 mg. Sia M2 la massa finale ottenuta.

7. *Calcolo ed espressione dei risultati.*

La massa del grasso estratto, espressa in grammi, è data dalla formula:

$$(M1 - M2) - (B1 - B2)$$

e il contenuto in grasso del campione, espresso come percentuale, è dato dalla formula:

$$\frac{(M1 - M2) - (B1 - B2)}{S} \times 100$$

dove:

M1 = massa, espressa in grammi, del pallone e del grasso dopo l'operazione 6.2.15;

M2 = massa, espressa in grammi, del pallone dopo l'operazione 6.2.1 o, in caso di presenza di residuo insolubile o di dubbio, dopo la fase 6.2.16.2;

B1 = massa, espressa in grammi, del pallone adoperato per la prova in bianco, dopo la fase 6.2.15;

B2 = massa, espressa in grammi, del pallone adoperato per la prova in bianco, dopo l'operazione 6.2.1 o, in caso di presenza di residuo insolubile o di dubbio, dopo la fase 6.2.16.2;

S = massa, espressa in grammi, del campione usato.

8. *Ripetibilità*

La differenza fra i risultati di due determinazioni, effettuate simultaneamente o in rapida successione dallo stesso analista adoperando lo stesso campione e nelle stesse condizioni non deve superare 0,05 g di grasso per 100 g del prodotto.

Metodo 4 — DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI MATERIA GRASSA (METODO RÖSE-GOTTLIEB)

1. *Oggetto e campo di applicazione.*

Il presente metodo serve a determinare il contenuto di materia grassa del:

- latte in polvere ricco di materia grassa o polvere di latte ricco di materia grassa;
- latte in polvere, latte intero in polvere, polvere di latte o polvere di latte intero;
- latte parzialmente scremato in polvere o polvere di latte parzialmente scremato;
- latte scremato in polvere o polvere di latte scremato.

2. *Definizione.*

Per contenuto in materia grassa dei vari tipi di latte in polvere s'intende il contenuto di materia grassa determinato con il presente metodo.

3. *Principio.*

Il contenuto in materia grassa viene determinato per estrazione, con etere etilico ed etere di petrolio, del grasso contenuto in una soluzione alcolica ammoniacale del campione seguita da evaporazione dei solventi, pesata del residuo e suo calcolo come percentuale sulla massa del campione, in conformità del principio di Röse-Gottlieb.

4. *Reattivi.*

Tutti i reattivi devono essere conformi ai requisiti specificati per la prova in bianco (6.1). Se necessario, i reattivi possono essere ridistillati in presenza di circa 1 g di grasso di burro per ogni 100 ml di solvente.

4.1. Soluzione di ammoniaca, al 25% circa (m/m) di $NH3$ (densità 20 °C = 0,91), o soluzione più concentrata a titolo noto.

4.2. Etanolo al 96 ± 2% (v/v), ovvero, se esso non è disponibile, etanolo denaturato con metanolo, etilmetilchetone od etere di petrolio.

4.3. Etere etilico, esente da perossidi

Nota 1: Per verificare l'assenza di perossidi, introdurre in un piccolo cilindro di vetro a tappo smerigliato, previamente lavato con etere, 10 ml dell'etere stesso ed 1 ml di soluzione al 10% di ioduro di potassio, preparata di recente. Agitare e lasciar riposare per 1 minuto. Nessuno dei due strati deve colorarsi di giallo.

Nota 2: L'etere etilico può essere mantenuto esente da perossidi introducendovi una lamina di zinco, umida per essere stata completamente immersa per 1 minuto in una soluzione diluita e acidificata di solfato di rame e successivamente risciacquata con acqua. Per ogni litro di soluzione impiegare circa 8000 mm² di lamina di zinco, tagliata in strisce abbastanza lunghe da raggiungere almeno la metà superiore del recipiente.

4.4. Etere di petrolio, con intervallo di ebollizione compreso tra 30 e 60 °C.

4 5. Miscela solvente, da preparare poco prima dell'uso mescolando volumi uguali di etere etilico (4.3) e di etere di petrolio (4.4) (tutte le volte che si parla di solvente misto, esso può essere sostituito dall'etere etilico o dall'etere di petrolio da soli)

5. *Apparecchiatura.*

5 1. Bilancia analitica.

5 2. Apparecchio da estrazione tubi o palloni da estrazione, provvisti di tappo smerigliato, o di altri materiali inerti rispetto ai solventi impiegati

5.3. Palloni a fondo piatto, della capacità di 150-250 ml.

5.4. Stufa da essiccazione a pressione atmosferica, ben ventilata e termostatata a 102 ± 1 °C.

5.5. Granuli per regolare l'ebollizione, esenti da grassi, non porosi e non friabili durante l'uso, come ad esempio perline di vetro o frammenti di carburo di silicio (l'impiego di questo materiale è facoltativo; vedi punto 6.2.1).

5.6. Bagnomaria, a 60-70 °C.

5.7. Sifone, adattabile ai tubi da estrazione

5 8 Centrifuga

6 *Modo di operare*

6.1. Prova in bianco

Contemporaneamente alla determinazione del contenuto in materia grassa nel campione, effettuare una prova in bianco su 10 ml d'acqua, usando lo stesso tipo di apparecchiatura di estrazione, gli stessi reagenti nelle stesse quantità e lo stesso procedimento qui di seguito descritto, salvo il punto 6.2.2. Se il risultato sulla prova in bianco supera 0,5 mg, i reattivi vanno sottoposti a controllo e quelli impuri vanno purificati o sostituiti.

6 2. Determinazione

6 2 1 Essiccare un pallone (5.3) (se necessario, unitamente ad alcuni granuli (5 5), destinati a regolare l'ebollizione durante la successiva eliminazione dei solventi), mantenendolo in stufa (5.4) per 30 minuti-1 ora. Lasciare che il recipiente assuma la temperatura della sala delle bilance e pesare con precisione, dopo raffreddamento, con l'approssimazione di 0,1 mg.

6.2.2. Pesare accuratamente, direttamente nell'apparecchio da estrazione o per differenza, con l'approssimazione di 0,1 mg, circa 1 g di latte intero in polvere o circa 1,5 g di latte in polvere parzialmente o totalmente scremato. Aggiungere 10 ml d'acqua e agitare dolcemente fino a dispersione completa (per taluni campioni può essere necessario riscaldare).

6.2 3. Aggiungere 1,5 ml di ammoniaca al 25% (4.1), od un corrispondente volume di soluzione più concentrata e riscaldare in bagnomaria a 60-70°C per 15 minuti, agitando di tanto in tanto.

Raffreddare (per esempio, sotto acqua corrente).

6 2 4. Aggiungere 10 ml di etanolo (4.2), e mescolare i liquidi, dolcemente ma a fondo, nell'apparecchio non chiuso.

6.2 5. Aggiungere 25 ml di etere etilico (4.3). Se necessario, raffreddare sotto acqua corrente; chiudere l'apparecchio e agitarlo vigorosamente per 1 minuto, capovolgendolo più volte.

6.2.6. Togliere con precauzione il tappo ed aggiungere 25 ml di etere di petrolio (4.4), utilizzando i primi ml per lavare il tappo e l'interno del collo dell'apparecchio e raccogliendo il liquido di lavaggio nell'interno di questo. Riapplicare il tappo; scuotere e capovolgere più volte per 30 secondi. Non agitare troppo vigorosamente se non è previsto l'uso della centrifuga (vedi punto 6.2.7).

6.2.7. Lasciar riposare l'apparecchio finché lo strato superiore del liquido è divenuto limpido e si è nettamente separato dallo strato acquoso inferiore. Si può anche effettuare la separazione adoperando una centrifuga adatta.

Nota: Se si impiega una centrifuga non azionata da un motore trifase, possono aversi delle scintille, e pertanto si curerà di evitare esplosioni o incendi dovuti a vapori di etere (provenienti, ad esempio, da una provetta rotta).

6.2.8. Togliere il tappo, lavare il tappo stesso e l'interno del collo dell'apparecchio con pochi millilitri di miscela solvente (4 5), raccogliendo il liquido di lavaggio nell'apparecchio. Travasare con precauzione la massima parte possibile dello strato superiore di liquido decantandolo o sifonandolo (5.6) nel pallone preparato (6.2.1).

Nota: Se il travaso non viene effettuato per sifonaggio, può essere necessario aggiungere un pò d'acqua per sollevare la superficie di contatto fra i due liquidi in modo da facilitare la decantazione.

6.2.9. Lavare l'esterno e l interno del collo dell'apparecchio o la estremità e la parte inferiore del sifone con pochi millilitri di miscela solvente. Fare in modo che il liquido di lavaggio dell'esterno dell'apparecchio defluisca nel pallone e che il liquido di lavaggio dell'interno del collo e del sifone defluisca nell'apparecchio di estrazione.

6 2 10. Procedere a una seconda estrazione ripetendo le fasi da 6.2.5 a 6.2.9 compresa, ma adoperando soltanto 15 ml di etere etilico e 15 ml di etere di petrolio.

6 2.11. Effettuare una terza estrazione ripetendo il procedimento 6.2 10, ma omettendo il lavaggio finale (6 2.9).

Nota: Quando si analizzano campioni di latte scremato in polvere, questa terza estrazione non è necessaria.

6 2 12. Evaporare o distillare con precauzione la massima quantità possibile di solvente (compreso l'etanolo). Se il recipiente è di piccola capacità, dopo ogni estrazione sarà necessario eliminare nel modo sopra indicato una parte del solvente.

6 2 13 Quando l'odore di solvente non è più percepibile, porre il recipiente nella stufa, coricato su un fianco, e riscaldarlo per un'ora

6.2.14. Togliere il recipiente dalla stufa, lasciarlo raffreddare alla temperatura della sala delle bilance e pesarlo con la approssimazione di 0,1 mg.

6.2 15. Ripetere le operazioni 6.2 13 e 6.2.14, con tempi di riscaldamento di 30-60 minuti finché la differenza fra due successive pesate sia inferiore a 0,5 mg ovvero si osservi un aumento della massa. Se tale aumento si verifica, nel calcolo di cui al punto 7.1 impiegare il valore più basso trovato per la massa. Sia M1 la massa finale ottenuta.

6.2.16 Aggiungere 15-25 ml di etere di petrolio, per confermare che la sostanza estratta è completamente solubile. Riscaldare blandamente ed agitare il solvente in senso rotatorio finché il grasso è disciolto.

6 2.16.1. Se la sostanza estratta è completamente solubile nell'etere di petrolio, la massa del grasso è data dalla differenza fra le masse determinate nel modo indicato ai punti 6.2.1. e 6.2.15.

6.2.16.2. Se è presente una certa quantità di residuo insolubile, o in caso di dubbio, estrarre completamente il grasso dal recipiente lavando ripetutamente con etere di petrolio tiepido,

facendo in modo che il residuo insolubile si depositi prima di ogni decantazione Lavare tre volte l'esterno del collo del recipiente.

Riscaldare per 1 ora in stufa il recipiente, deposto sul fianco; lasciarlo raffreddare alla temperatura della sala delle bilance come prima indicato al punto 6 2.1 e pesare con l'approssimazione di 0,1 mg. Sia M2 la massa finale ottenuta.

7. *Calcolo ed espressioni dei risultati*

La massa del grasso estratto, espressa in grammi, è data dalla formula:

$$(M1 - M2) - (B1 - B2)$$

e il contenuto in grasso del campione, espresso come percentuale, è dato dalla formula:

$$\frac{(M1 - M2) - (B1 - B2)}{S} \times 100$$

dove:

M1 = massa, espressa in grammi, del pallone e del grasso dopo l'operazione 6.2 15;

M2 = massa, espressa in grammi, del pallone, dopo l'operazione 6.2.1 o, in caso di presenza di residuo insolubile o di dubbio, dopo la fase 6.2 16.1;

B1 = massa, espressa in grammi, del pallone adoperato per la prova in bianco, dopo la fase 6.2 15;

B2 = massa, espressa in grammi del pallone adoperato per la prova in bianco, dopo l'operazione 6.2.1 o, in caso di presenza di residuo insolubile o di dubbio, dopo la fase 6.2.16 2;

S = massa, espressa in grammi, del campione usato

8. *Ripetibilità.*

La differenza fra i risultati di due determinazioni, effettuate simultaneamente o in rapida successione dallo stesso analista adoperando lo stesso campione e nelle stesse condizioni; non deve superare 0,2 g di grasso per 100 g del prodotto, ad eccezione del latte scremato per il quale non deve superare 0,1 g per 100 g di prodotto.

Metodo 5 — DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN SACCAROSIO (METODO POLARIMETRICO)

1. *Oggetto e campo di applicazione.*

Il presente metodo serve a determinare il contenuto di saccarosio nel:

- latte concentrato zuccherato o latte intero concentrato zuccherato;
- latte concentrato parzialmente scremato zuccherato;
- latte concentrato scremato zuccherato.

I campioni non devono contenere zucchero invertito.

2. *Definizione*

Per « contenuto in saccarosio » nei latti concentrati zuccherati s'intende il contenuto in saccarosio determinato con il presente metodo.

3. *Principio*

Il metodo è basato sul principio dell'inversione secondo Clerget, consistente in un blando trattamento del campione con un acido, tale da provocare l'idrolisi del saccarosio ma da restare praticamente senza effetto sul lattosio o su altri zuccheri. Il contenuto di saccarosio viene ricavato dalla variazione del potere rotatorio della soluzione. Si prepara un filtrato limpido del campione, esente da mutarotazione dovuta al lattosio, trattando la soluzione con ammoniaca, poi neutralizzandola e defecandola per aggiunta successiva di soluzioni di acetato di zinco e di ferrocianuro di potassio. Si procede quindi all'idrolisi specifica del saccarosio su un'aliquota del filtrato.

Dal potere rotatorio del filtrato prima e dopo inversione è possibile, mediante opportune formule, calcolare il contenuto in saccarosio.

4. *Reattivi*

4.1. Soluzione di acetato di zinco, 1 M sciogliere in acqua 21,9 g di acetato di zinco biidrato cristallizzato e 3 ml di acido acetico glaciale, e portare con acqua a 100 ml.

4 2 Soluzione di ferrocianuro di potassio, 0,25 M: sciogliere in acqua 10,6 g di ferrocianuro di potassio triidrato e portare a 100 ml con acqua.

4.3. Soluzione di acido cloridrico, 6,35 ± 0,20 M (20-22% m/m) o 5,0 ± 0,2 M (16-18% m/m).

4 4 Soluzione di ammoniaca, 2,0 ± 0,2 M (3,5% m/m).

4.5. Soluzione di acido acetico, 2,0 ± 0,2 M (12% m/m).

4.6. Blu di bromotimolo (indicatore): soluzione all'1% (m/v) in etanolo.

5. *Apparecchiatura.*

5.1. Bilancia, sensibilità 10 mg.

5.2. Tubo polarimetrico, della lunghezza di 2 dm.

5.3. Polarimetro o saccarimetro:

a) polarimetro a luce di sodio o a luce verde di mercurio (lampada a vapori di mercurio con prisma o schermo speciale Wratten n. 77 A), con precisione di lettura di almeno 0,05 gradi d'angolo;

b) saccarimetro con scala saccarimetrica internazionale, illuminato facendo passare la luce bianca attraverso un filtro costituito da uno spessore di 15 mm di una soluzione al 6% di bicromato di potassio, ovvero mediante una lampada al sodio, e con precisione di lettura di al meno 0,1 gradi della scala saccarimetrica internazionale.

5.4. Bagnomaria, regolato su 60 ± 1°C.

6. *Modo di operare.*

6.1. Determinazione di controllo.

Per standardizzare il procedimento, i reattivi e l'apparecchiatura, effettuare in doppio una determinazione di controllo, nel modo appresso indicato, impiegando una miscela di 100 g di latte, o 110 g di latte scremato, più 18,00 g di saccarosio puro, corrispondente a 40,00 g di latte concentrato contenente il 45% di saccarosio. Calcolare il contenuto di zucchero applicando la formula indicata al punto 7, sostituendo rispettivamente ad M, F e P, nella formula 1, la quantità di latte prelevata e il contenuto in grassi e in proteine di tale latte, e sostituendo ad M, nella formula 2, il valore di 4,00. La media dei valori trovati deve essere uguale a 45,0 ± 0,2%.

6.2. Determinazione.

6.2.1. In un becher da 100 ml, pesare con l'approssimazione di 10 mg circa 40 g del campione ben rimescolato. Aggiungere 50 ml di acqua calda a 80-90°C e mescolare bene.

6.2.2. Trasferire quantitativamente la miscela in un pallone tarato da 200 ml, risciacquando successivamente il becher con acqua a 60°C, finché il volume totale sia compreso tra 120 e 150 ml. Mescolare e raffreddare a temperatura ambiente.

6.2.3. Aggiungere 5 ml della soluzione diluita di ammoniaca (4.4). Mescolare di nuovo e lasciar riposare per 15 minuti.

6.2.4. Neutralizzare l'ammoniaca aggiungendo una quantità equivalente della soluzione diluita di acido acetico (4.5), determinata in precedenza titolando la soluzione di ammoniaca in presenza di blu di bromotimolo (4.6) ed agitare.

6.2.5. Mescolando dolcemente facendo ruotare il pallone inclinato, aggiungere 12,5 ml di soluzione di acetato di zinco (4.1).

6.2 6. Aggiungere 12 ml di soluzione di ferrocianuro di potassio (4.2), analogamente a quanto fatto per la soluzione di acetato.

6.2.7. Portare il contenuto del pallone a 20°C e diluire a 200 ml con acqua a 20°C.

Nota: Durante ciascuna delle fasi fin qui descritte, tutte le aggiunte di acqua o di reattivi debbono essere fatte in modo da evitare la formazione di bolle d'aria; per la stessa ragione bisogna rimescolare facendo ruotare il pallone anziché scuotendolo. L'eliminazione delle bolle d'aria eventualmente presenti prima di portare al volume di 200 ml può essere facilitata collegando provvisoriamente il pallone a una pompa a vuoto e facendolo ruotare.

6.2.8. Chiudere il pallone con un tappo asciutto e agitare energicamente.

6.2.9. Lasciar riposare per qualche minuto, poi filtrare su filtro a pieghe asciutto, scartando i primi 25 ml di filtrato.

6.2.10. Polarizzazione diretta: determinare la rotazione ottica del filtrato a 20 ± 1° C.

6.2.11. Inversione: in un pallone tarato da 50 ml pipettare 40 m del filtrato sopra ottenuto. Aggiungere 6,0 ml di acido cloridrico 6,35 M (4.3) oppure 7,6 ml di acido cloridrico 5,00 M (4.3).

Porre il pallone in bagnomaria a 60°C per 15 minuti, accertandosi che la soluzione resti completamente immersa Mescolare con un *movimento rotatorio* per i primi 5 minuti, durante i quali il contenuto del pallone dovrebbe aver raggiunto la temperatura del bagno. Raffreddare a 20°C e portare a volume con acqua a 20°C. Rimescolare e lasciar riposare per un'ora a tale temperatura.

6.2.12. Polarizzazione dopo l'inversione.
Determinare la rotazione ottica a 20 ± 0,2°C della soluzione invertita (se durante la misura il campo di variazione della temperatura T del liquido contenuto nel tubo del polarimetro varia di oltre ± 0,2°C, va applicata la correzione per la temperatura di cui al punto 7.2).

7. *Calcolo ed espressione dei risultati.*

Calcolare il contenuto percentuale, in saccarosio mediante le seguenti formule:

1. $$v = \frac{M}{100} (1{,}08F + 1{,}55P)$$

2. $$S = \frac{D - 1{,}25\ I}{Q} \times \frac{V - v}{V} \times \frac{V}{L \times M} \times 100$$

dove:

S = contenuto percentuale in saccarosio;
M = massa in grammi del campione pesato;
F = percentuale di materia grassa contenuta nel campione;
P = percentuale di proteine (N × 6,38) contenuta nel campione;
V = volume in ml al quale il campione è stato diluito prima della filtrazione;
v = correzione in ml per il volume di precipitato formato durante la defecazione;
D = lettura diretta al polarimetro (polarizzazione prima dell'inversione);
I = lettura al polarimetro dopo l'inversione;
L = lunghezza in dm del tubo polarimetrico;
Q = fattore d'inversione (7.2).

Osservazioni:

a) Quando si pesano esattamente 40,00 g di latte concentrato e si impiegano un polarimetro a luce di sodio graduato in gradi d'angolo e un tubo polarimetrico da 2 dm alla temperatura di 20,0°C ± 0,1°C, il contenuto in saccarosio del latte concentrato normale (C = 9) può essere calcolato con la seguente formula:

$$S = (D - 1{,}25\ I)\ (2{,}833 - 0{,}00612\ F - 0{,}00878\ P).$$

b) Se la polarizzazione dopo inversione è misurata a temperatura diversa da 20°C, i valori trovati vanno moltiplicati per il fattore I + 0,0037 (T — 20).

7.1. Valori del fattore d'inversione Q.
Le seguenti formule danno dei valori precisi di Q per varie sorgenti luminose, con le opportune correzioni per la concentrazione e la temperatura:

luce di sodio e polarimetro graduato in gradi d'angolo:

$$Q = 0{,}8825 + 0{,}0006\ (C - 9) - 0{,}0033\ (T - 20);$$

luce verde del mercurio e polarimetro graduato in gradi d'angolo:

$$Q = 1{,}0392 + 0{,}0007\ (C - 9) - 0{,}0039\ (T - 20);$$

luce bianca con filtro al bicromato e saccarimetro graduato in gradi saccarimetrici internazionali:

$$Q = 2{,}549 + 0{,}0017\ (C - 9) - 0{,}0095\ (T - 20).$$

Nelle precedenti formule

C = percentuale degli zuccheri totali nella soluzione invertita polarizzata;
T = temperatura in °C della soluzione invertita durante la lettura polarimetrica.

Nota 1: La percentuale di zuccheri totali C nella soluzione invertita può essere calcolata nel modo abituale in base alla lettura diretta e al cambiamento d'inversione, adoperando i valori usuali per la rotazione specifica del saccarosio, del lattosio e dello zucchero invertito.

La correzione 0,0006 (C — 9) ecc. è precisa soltanto se è $C \cong 9$; per il normale latte condensato essa può essere trascurata, in quanto C è vicino a 9.

Nota 2: Variazioni di ± 1°C dalla temperatura di 20°C non influiscono sensibilmente sulla lettura diretta, ma una variazione di oltre 0,2°C nella lettura della soluzione invertita impone la necessità di una correzione.

La correzione — 0,0033 (T — 20) ecc. è precisa soltanto fra i 18° e 22°C.

8. *Ripetibilità.*

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate simultaneamente o in rapida successione dallo stesso analista, adoperando lo stesso campione e nelle stesse condizioni, non deve superare 0,3 grammi di saccarosio per 100 g di latte concentrato.

Metodo 6 — Determinazione del contenuto in acido lattico e lattati

1. *Oggetto e campo di applicazione.*

Il presente metodo serve a determinare la quantità di acido lattico e di lattati, espressi come acido lattico:

- nel latte in polvere ricco di materia grassa o polvere di latte ricca di materia grassa;
- nel latte in polvere, latte intero in polvere, polvere di latte o polvere di latte intero;
- nel latte parzialmente scremato in polvere o polvere di latte parzialmente scremato;
- nel latte scremato in polvere o polvere di latte scremato.

2. *Definizione.*

Per contenuto in acido lattico e lattati dei latti in polvere s'intende il contenuto in acido lattico e lattati, espressi come acido lattico, determinato con il presente metodo.

3. *Principio.*

Da una soluzione del campione si provvede ad eliminare contemporaneamente la materia grassa, le proteine ed il lattosio aggiungendo soluzione di solfato di rame e di idrossido di calcio e filtrando.

L'acido lattico e i lattati contenuti nel filtrato vengono trasformati in acetaldeide aggiungendo acido solforico concentrato in presenza di solfato di rame.

Il contenuto di acido lattico viene determinato colorimetricamente impiegando p-idrossidifenile.

L'acido lattico ed i lattati sono espressi come milligrammi di acido lattico contenuti in 100 g di solidi magri.

4. *Reattivi.*

4.1. Soluzione di solfato rameico: sciogliere in acqua 250 g di solfato rameico pentaidrato e portare a 1000 ml con acqua.

4 2 Sospensione di idrossido di calcio: in un mortaio, frantumare con acqua 300 g di idrossido di calcio, impiegando in tutto 900 ml di acqua. La sospensione deve essere preparata al momento dell'uso.

4.3. Soluzione acido solforico-solfato rameico: a 300 ml di acido solforico al 95,5 — 97,0% (m/m) aggiungere 0,5 ml della soluzione di solfato rameico (4.1).

4.4. Soluzione di p-idrossidifenile (C6H5C6H4OH): agitando e riscaldando leggermente, sciogliere 0,75 g di p-idrossidifenile in 5 ml di soluzione acquosa di idrossido di sodio al 5% (m/v). Portare a 50 ml con acqua in un pallone tarato. Conservare la soluzione in bottiglie di vetro bruno e in luogo oscuro e fresco. La soluzione non va impiegata se si manifestano variazioni di colore o intorbidamenti. La massima conservabilità è di 72 ore.

4.5. Soluzione standard di acido lattico: sciogliere in acqua 0,1067 g di lattato di litio e portare a 1000 ml in pallone tarato. 1 ml di questa soluzione corrisponde a 0,1 mg di acido lattico.

4.6. Latte ricostituito standard: per la preparazione della curva di taratura approntare un campione di latte ricostituendolo a partire da un latte in polvere di ottima qualità e comunque con un contenuto di acido lattico non superiore a 30 mg per 100 g di solidi magri. Seguire le modalità descritte più oltre ai punti 6.2.1 e 6.2.2.

5. *Apparecchiatura.*

5.1. Bilancia analitica.

5.2. Spettrofotometro.

5.3. Bagnomaria termostatabile.

5.4. Mortaio e pestello.

5.5. Carta da filtro (Schleicher & Schull 595, Whatman 1 o equivalente).

5.6. Tubi da saggio, in pirex o equivalenti (dimensioni: 25 × 150 mm).

Nota: Tutta la vetreria deve essere perfettamente pulita e destinata ad essere usata soltanto per questa determinazione.

6. *Modo di operare.*

6.1. Prova in bianco.

Effettuare una prova in bianco ponendo 30 ml di acqua in un matraccio tarato da 50 ml e trattando come prescritto ai punti da 6.2.4 a 6.2.11 compreso. Se il bianco, misurato in confronto con l'acqua, supera l'equivalente di 20 mg di acido lattico in 100 g di solidi magri, i reattivi devono essere controllati e i reagenti impuri sostituiti. La prova in bianco va effettuata contemporaneamente all'analisi del campione.

6 2. Determinazione

6 2.1. Determinare il contenuto in solidi magri (a) del campione, sottraendo da 100 il contenuto in grassi (ottenuto con il metodo 4) e il contenuto in umidità (ottenuto con il metodo 2).

6 2.2. Pesare $\left(\frac{1000}{a - 10}\right)$ grammi del campione con l'approssimazione di 0,1 g. Trasferire in pallone tarato, portare a 100 ml con acqua e mescolare energicamente.

6.2.3. Pipettare 5 ml della soluzione ottenuta in un cilindro graduato da 50 ml; diluire con acqua a 30 ml.

6.2.4 Agitando continuamente, aggiungere 3 ml della soluzione di solfato rameico (4.1) e lasciar riposare 10 minuti.

6.2.5. Agitando continuamente, aggiungere 10 ml della sospensione di idrossido di calcio (4.2).

6.2.6. Portare a 50 ml con acqua, agitare vigorosamente, lasciar riposare per 10 minuti poi filtrare. Eliminare la prima porzione di filtrato.

6.2.7. Pipettare 1 ml del filtrato in un tubo da saggio (5 6)

6.2.8. Con una buretta o pipetta graduata, aggiungere nel tubo 6,0 ml della soluzione di acido solforico-solfato di rame (4.3) Mescolare.

6.2.9. Riscaldare in bagnomaria bollente per 5 minuti. Riportare a temperatura ambiente raffreddando sotto acqua corrente.

6.2.10. Aggiungere 2 gocce della soluzione di p-idrossidifenile (4.4) ed agitare vigorosamente. Porre il tubo in bagnomaria a 30 ± 2°C: mantenervelo per 15 minuti, agitando di tanto in tanto.

6.2.11. Porre il tubo in bagnomaria bollente per 90 secondi. Riportare a temperatura ambiente raffreddando sotto acqua corrente.

6.2.12. Misurare entro 3 ore la densità ottica contro la prova in bianco (6.1) a 570 nm.

6 2.13. Se la densità ottica supera quella del punto più elevato della curva standard, ripetere la prova diluendo adeguatamente il filtrato di cui al punto 6.2 6.

6.3. Preparazione della curva di taratura.

6 3.1. In 5 cilindri graduati da 50 ml pipettare 5 ml del latte ricostituito (4 6), poi, rispettivamente, 0, 1, 2, 3 e 4 ml della soluzione standard (4.5), in modo da ottenere un campo standard corrispondenti a 0, 20, 40, 60 e 80 mg di acido lattico aggiunto riferiti a 100 g di solidi magri del latte essiccato.

6 3 2 Diluire con acqua a 30 ml circa procedere come descritto ai punti da 6.2.4 a 6 2 11 compreso

6 3.3. Misurare le densità ottiche degli standard (6.3.1) contro il « bianco » a 570 nm. Diagrammare le densità ottiche in funzione delle quantità di acido lattico indicate al punto 6.3.1.

Tracciare la retta che si adatta meglio ai punti riportati sul diagramma e ricavare la curva di taratura spostando tale retta parallelemente a sè stessa in modo da farla passare attraverso l'origine.

7. *Espressione dei risultati.*

Facendo riferimento alla curva di taratura, trasformare la densità ottica misurata secondo 6 2 12 o 6 2.13 in mg di acido lattico riferiti a 100 g di solidi magri contenuti nel campione. Qualora il filtrato sia stato diluito secondo 6.2.13, moltiplicare il risultato per i fattori di diluizione.

8. *Ripetibilità*

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate simultaneamente o in rapida successione dallo stesso analista adoperando lo stesso campione e nelle stesse condizioni,

non deve superare 8 mg di acido lattico riferiti a 100 g di solidi magri. Ciò vale per contenuti fino a 80 mg. Per valori più alti, la differenza non deve superare il 10% del valore più basso.

Metodo 7 — DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ FOSFATASICA (METODO SANDERS E SAGER MODIFICATO)

1. *Oggetto e campo di applicazione.*

Il presente metodo descrive la determinazione dell'attività fosfatasica nel:

- latte in polvere ricco di materia grassa o polvere di latte ricco di materia grassa;
- latte in polvere, latte intero in polvere, polvere di latte o polvere di latte intero;
- latte parzialmente scremato in polvere o polvere di latte parzialmente scremato;
- latte scremato in polvere o polvere di latte scremato.

2. *Definizione.*

L'attività fosfatasica del latte in polvere è la misura della quantità di fosfatasi alcalina attiva presente. Essa è espressa come la quantità di fenolo in microgrammi, liberata da 1 ml del latte ricostituito, nel modo indicato dalla procedura appresso descritta.

3. *Principio.*

L'attività fosfatasica del latte in polvere è determinata dalla capacità della fosfatasi di liberare fenolo dal fenilfosfato disodico. La quantità di fenolo liberata nelle condizioni prescritte viene determinata per misura spettrofotometrica del colore ottenuto col reattivo di Gibbs.

4. *Reattivi.*

Tutti i reattivi devono essere preparati con acqua distillata bollita di recente.

4.1. Soluzione A.

Tampone borato-idrossido di bario: pH 10,6 ± 0,1 a 20°C.

Sciogliere in acqua 25,0 g di idrossido di bario octaidrato e portare a 500 ml.

Sciogliere in acqua 11,0 g di acido borico (H3B03), e portare a 500 ml.

Riscaldare le due soluzioni a 50°C e mescolare.

Agitare e lasciar raffreddare a temperatura ambiente.

Regolare il pH a 10,6 ± 0,1 con la soluzione di idrossido di bario: filtrare.

Conservare la soluzione in recipiente ermeticamente chiuso.

Prima dell'uso, diluire il tampone con un'uguale quantità d'acqua.

4.2. Soluzione B.

Tampone per lo sviluppo del colore.

Sciogliere in acqua 6,0 g di metaboratosodico anidro, 12,6 g di metaborato sodico tetraidrato e 20,0 g di cloruro di sodio: diluire con acqua a 1000 ml.

4.3. Soluzione C.

Substrato tamponato.

4.3.1. Sciogliere 0,5 g di fenilfosfato disodico biidrato in 4,5 ml di soluzione B (4.2). Aggiungere 2 gocce di soluzione E (4.5) e lasciar riposare 30 minuti. Estrarre il colore con 2,5 ml di butanolo (4.9). Se necessario, ripetere l'estrazione del colore. Dopo separazione delle fasi scartare il butanolo. Questa soluzione può conservarsi in frigorifero per diversi giorni. Sviluppare ed estrarre il colore ancora una volta prima dell'uso.

4.3.2. Pipettare 1 ml di questa soluzione in un pallone tarato da 100 ml e portare a volume con la soluzione A. Preparare la soluzione tampone immediatamente prima dell'uso.

4.4. Soluzione D

Precipitante.

Sciogliere 3,0 g di solfato di zinco eptaidrato e 0,6 g di soluzione di solfato rameico pentaidrato e portare a 100 ml con acqua.

4.5. Soluzione E.

Reattivo di Gibbs.

Sciogliere 0,040 g di 2,6 - dibromochinon 1,4 - cloroimmide in 10 ml di alcool etilico al 96%. Conservare in frigorifero in bottiglie di vetro scuro. Il reattivo va ripreparato quando cambia colore.

4.6. Tampone per la diluizione del colore.

Diluire a 100 ml, con acqua, 10 ml di soluzione (4.2) (tampone B per lo sviluppo del colore).

4.7. Soluzione di solfato rameico.

Sciogliere in acqua 0,05 g di solfato rameico pentaidrato e portare a 100 ml con acqua.

4.8. Soluzione standard di fenolo

Sciogliere in acqua 0,200 ± 0,001 g di fenolo puro e portare a segno in pallone tarato da 100 ml. Questa soluzione può essere conservata per diversi mesi in frigorifero. Con acqua, diluire 10 ml di questa soluzione a 100 ml. La soluzione diluita contiene 200 μg di fenolo in 1 ml e può essere utilizzata per preparare soluzioni più diluite.

4.9. n-Butanolo.

5. *Apparecchiatura.*

5.1. Bilancia analitica.

5 2. Bagnomaria, termostatabile a 37°C ± 1°C.

5.3. Spettrofotometro.

5.4. Carta da filtro (Schleicher e Schull 597, Whatman 42 o equivalente).

5.5. Bagnomaria bollente.

5.6. Foglio di alluminio.

6. *Modo di operare.*

Nel corso dell'analisi è necessario adottare le seguenti precauzioni:

- Evitare l'esposizione diretta alla luce solare.
- Risciacquare, far bollire con acqua o trattare con vapore, vetreria, tappi, spatole, ecc..
- Evitare l'impiego di materiali plastici (ad esempio per i tappi), in quanto possono contenere fenoli.
- Evitare accuratamente la contaminazione da tracce di saliva e di sudore.

6.1. Preparazione del campione

6.1.1. Pesare 10 g del campione con l'approssimazione di 0,1 g e scioglierli in 90 ml di acqua. La temperatura a cui viene disciolta la polvere non deve in nessun caso superare i 35°C.

6.2. Determinazione

6.2.1. In due tubi da saggio introdurre 1 ml di latte ricostituito preparato come descritto al punto 6.1.1.

6.2.2. Riscaldare per 2 minuti uno dei tubi in acqua bollente. Coprire con foglio di alluminio il tubo e il bagnomaria (5.5), che potrebbe ad esempio essere un becher, in modo da assicurare che tutto il tubo venga riscaldato. Raffreddare in acqua fredda fino a temperatura ambiente Impiegare questo tubo per la prova in bianco. Per tutte le operazioni successive, i due tubi vanno trattati allo stesso modo.

6.2.3. Aggiungere 10 ml della soluzione C (4.3.2). Mescolare e porre il tubo in bagnomaria a 37°C (5.2).

6.2.4. Tenere in incubazione nel bagnomaria per 60 minuti, agitando di tanto in tanto.

6.2.5. Trasferire immediatamente le provette in bagno bollente (5.5) e riscaldarle per 2 minuti; raffreddare a temperatura ambiente in acqua fredda.

6.2.6. Aggiungere 1 ml di soluzione D (4.4), mescolare e filtrare per filtro asciutto; buttar via le prime porzioni del filtrato, finché esso diviene limpido.

6.2.7. Porre 5 ml di ciascun filtrato in due provette, aggiungere 5 ml di soluzione B (4.2) e 0,1 ml di soluzione E (4.5). Mescolare.

6.2.8. Lasciar sviluppare il colore a temperatura ambiente, per 30 minuti, al riparo dalla luce solare.

6.2.9. Misurare la densità ottica della soluzione del campione contro quella del « bianco » a 610 nm.

6 2 10. Ripetere la determinazione qualora la densità ottica della soluzione sia superiore a quella del campione standard preparato secondo il punto 7 e contenente 20 μg di fenolo.

Se tale limite è superato, diluire un opportuno volume del latte, ricostituito secondo quanto indicato in 6.1.1., con un adeguato volume dello stesso latte, fatto accuratamente bollire come indicato al punto 6.2.2., in modo da inattivare la fosfatasi in esso contenuta.

7. *Costruzione della curva di taratura.*

7.1. In quattro matracci tarati da 100 ml pipettare rispettivamente 1, 3, 5 e 10 ml della soluzione standard, diluita secondo quanto descritto al punto 4.8, e portare a volume con acqua: queste diluizioni conterranno rispettivamente 2, 6, 10 e 20 μg/ml di fenolo.

7.2. Pipettare nelle provette 1 ml di ciascuna delle soluzioni standard 7.1, in modo da ottenere una serie di campioni contenente 0, 2, 6, 10 e 20 μg di fenolo. Preparare un « bianco » con 1 ml di acqua.

7.3. In ciascuna delle provette, pipettare successivamente 1 ml della soluzione di solfato di rame (4.7), 5 ml della soluzione tampone per la diluizione del colore (4.6), 3 ml di acqua e 0,1 ml della soluzione E (4.5). Mescolare.

7.4. Lasciar riposare le provette per 30 minuti, a temperatura ambiente e al riparo dalla luce solare diretta.

7 5. Misurare l'assorbanza delle soluzioni in ciascuno dei tubi, in confronto col « bianco » a 610 nm.

7.6. Costruire la curva di taratura riportando i valori dell'assorbanza in funzione delle quantità di fenolo espresso in μg, come indicato al punto 7.2.

8. *Calcolo ed espressione dei risultati.*

8.1. Facendo riferimento alla curva di taratura, trasformare in μg di fenolo i valori trovati secondo 6.2.9.

8.2. Calcolare l'attività fosfatasica, espressa in μg di fenolo/ml di latte ricostituito, mediante la seguente formula:

attività fostatasica = 2,4 P.

dove P = quantità di fenolo in μg secondo 8.1.1.

8.3. Se è stato necessario diluire come indicato in 6.2.10, moltiplicare per il fattore di diluizione il risultato ottenuto secondo 8.1.2.

9. *Ripetibilità.*

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate simultaneamente o in rapida successione dallo stesso analista adoperando lo stesso campione e nelle stesse condizioni, non debbono superare i 2 μg di fenolo liberati per ogni ml di latte ricostituito.

Metodo 8 — DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ FOSFATASICA (PROCEDIMENTO ASCHAFFENBURG E MULLEN)

1. *Oggetto e campo di applicazione.*

Questo metodo descrive la determinazione dell'attività fosfatasica nel:

- latte in polvere ricco di materia grassa o polvere di latte ricco di materia grassa;
- latte in polvere, latte intero in polvere, polvere di latte, o polvere di latte intero;
- latte parzialmente scremato in polvere o polveredi latte parzialmente scremato;
- latte scremato in polvere o polvere di latte scremato.

2. *Definizione.*

L'attività fosfatasica del latte in polvere è la misura della quantità di fosfatasi alcalina attiva presente nel prodotto. Essa è espressa come quantità di p-nitrofenolo, in microgrammi, liberata nelle condizioni descritte da 1 ml di latte ricostituito.

3. *Principio.*

Il campione di latte ricostituito viene diluito con un substrato tamponato a pH 10,2 e messo in incubazione alla temperatura di 37°C per 2 ore. In queste condizioni, qualunque fosfatasi alcalina presente nel campione provocherà la liberazione del p-nitrofenolo dal p-nitrofenilfosfato disodico aggiunto. Il p-nitrofenolo liberato viene determinato in un comparatore semplice, alla luce riflessa, per confronto con vetri standard.

4. *Reattivi.*

4.1. Soluzione tampone carbonato-bicarbonato sodico.

Sciogliere in acqua 3,5 g di carbonato sodico anidro ed 1,5 g di bicarbonato sodico; portare con acqua a 1000 ml in pallone tarato.

4 2 Substrato tamponato

Sciogliere 1,5 g di p-nitrofenilfosfato disodico nel tampone carbonato bicarbonato sodico (4 1) e portare a 1000 ml con soluzione tampone in pallone tarato.

Questa soluzione, se conservata in frigorifero, è stabile per un mese comunque controllata come precisato al punto 6.

4 3 Soluzioni defecanti.

4 3 1. Soluzione di solfato di zinco.

Sciogliere in acqua 30,0 g di solfato di zinco eptaidrato e diluire con acqua a 100 ml in pallone tarato

4 3 2 Soluzione di ferrocianuro di potassio

Sciogliere in acqua 17,2 g di ferrocianuro di potassio triidrato e diluire con acqua a 100 ml in pallone tarato.

5. *Apparecchiatura.*

5 1 Bilancia analitica.

5 2 Bagnomaria, termostatabile a 37°C ± 1°C

5 3. Colorimetro a comparazione, con disco speciale contenente vetri colorati standard tarati in p-nitrofenolo per ml di latte e provvisto di celle da 2 × 25 mm.

6. *Modo di operare.*

Nel corso dell'analisi è necessario adottare le seguenti precauzioni:

- Evitare l'esposizione diretta alla luce solare;
- Risciacquare con un detergente alcalino, far bollire con acqua o trattare con vapore vetreria, tappi, spatole, ecc.;
- Evitare accuratamente la contaminazione da tracce di saliva e di sudore;
- La soluzione tamponata del substrato (4.2) deve rimanere stabile per almeno 1 mese se conservata in frigorifero a 4°C o meno. L'eventuale instabilità è indicata da una colorazione gialla. La prova viene sempre letta in confronto con un prodotto di riferimento previamente bollito e contenente lo stesso substrato tamponato; si raccomanda di non usare la soluzione qualora essa, confrontata nel comparatore con acqua distillata in celle da 25 mm, dia una lettura colorimetrica superiore a 10 μg.

6 1. Preparazione del campione

Sciogliere 10 g della polvere in 90 ml di acqua La temperatura di dissoluzione non deve superare i 35°C.

6 2. Determinazione.

6 2.1. Pipettare 15 ml di substrato tamponato (4.2) in una provetta pulita ed asciutta, aggiungendo subito dopo 2 ml del campione ricostituito (6.1) da esaminare. Tappare la provetta, mescolare capovolgendo e porre a bagnomaria a 37°C (5.2).

6.2 2 Contemporaneamente, porre nel bagnomaria una provetta di riferimento contenente 15 ml di substrato tamponato e 2 ml di campione ricostituito bollito analogo a quello sotto prova.

6 2 3 Dopo 2 ore togliere ambedue le provette dal bagnomaria, aggiungere 0,5 ml di precipitante al solfato di zinco (4.3.1), rimettere il tappo, agitare energicamente e lasciar riposare per 3 minuti. Aggiungere 0,5 ml di soluzione di precipitante al ferrocianuro di potassio (4 3.2), mescolare bene e filtrare per filtro a pieghe (5.4), raccogliendo il filtrato limpido in una provetta pulita.

6 2 4. Trasferire il filtrato in una cella da 25 mm e confrontare nel colorimetro a comparazione contro il filtrato del campione di riferimento bollito, adoperando il disco speciale (5.3).

7. *Calcolo ed espressione dei risultati*

La lettura diretta ottenuta al punto 6.2 4 viene registrata come μg di p-nitrofenolo per ml di campione o per ml di campione ricostituito.

8. *Ripetibilità*

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate simultaneamente o in rapida successione dallo stesso analista, adoperando lo stesso campione e nelle stesse condizioni, non deve superare 2 μg di p-nitrofenolo per ml del latte ricostituito.

(4296)